

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001158735
PUBLICATION DATE : 12-06-01

APPLICATION DATE : 30-11-99
APPLICATION NUMBER : 11340174

APPLICANT : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD;

INVENTOR : AOE SEIICHIRO;

INT.CL. : A61K 31/164 A23L 1/30 A61K 7/16 A61K 31/688 A61K 31/7032 A61P 1/02 A61P 19/00

TITLE : AGENT FOR PREVENTING AND IMPROVING PERIODONTAL DISEASE

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an agent for preventing and improving periodontal disease, and to provide a drink, food or feed to which an effect for preventing and improving the periodontal disease is imparted.

SOLUTION: This agent for preventing or improving the periodontal disease, containing a sphingosine skeleton-having compound such as ceramide, sphingomyelin, a sphingoglycolipid or ganglioside as an active ingredient, or containing the sphingosine skeleton-having compound and further suitably one or more substances selected from calcium agents, vitamin D and vitamin K.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

JP2001158735

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The prevention and the improvement agent of gum disease which make an active principle the compound which has a sphingosine frame.

[Claim 2] The prevention and the improvement agent of gum disease according to claim 1 whose compound which has a sphingosine frame is ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, or ganglioside.

[Claim 3] The eating-and-drinking article or feed which blended the compound which has a sphingosine frame and granted prevention and the improvement effect of gum disease.

[Translation done.]

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the prevention and the improvement agent of gum disease which make an active principle the compound which has a sphingosine frame. Moreover, this invention relates to the eating-and-drinking article or feed which blended the compound which has a sphingosine frame and granted prevention and the improvement effect of gum disease.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, gum disease serves as a big social problem. Gum disease carries out by the ability also not using the gear tooth which weakens a dental root and does not have a cavity unlike a cavity and is sick. Many people show the signs of gum disease and can say rather that it is illness more fearful than a cavity. Although prevention from a viewpoint that gargling which used removing a dental plaque, the collutory (mouthwash) of antimicrobial agent content, etc. as a prophylaxis of current and gum disease prevents propagation of the microorganism used as a cause bacillus is performed, these approaches are considered that effectiveness is small to the symptom which advanced too much. That is, reduction in an alveolar bone is seen and the last stage of gum disease comes that it will be hard to be reproduced once an alveolar bone is lost. And if a gear tooth is lost by gum disease, since it is accompanied by the pain outside it is hard coming to eat food and trouble will be caused to a life, prevention and the therapy means of effective gum disease are searched for. Thus, the prevention and the improvement agent of gum disease which have the effectiveness which controls reduction in an alveolar bone are not known for the present condition.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Gum disease is a big social problem and the method of preventing and improving these symptoms is searched for so that it may describe above. this invention persons found out that the effectiveness of preventing and improving gum disease was in the compound which has sphingosine frames, such as ceramide contained in cow's milk or a bovine brain, sphingomyelin, sphingoglycolipid,

and ganglioside, the place which has advanced research wholeheartedly so that they may get the matter which has prevention and the improvement effect of gum disease. And it came to complete a header and this invention for the effectiveness increasing by adding calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K. Therefore, this invention makes it a technical problem to offer the prevention and the improvement agent of the above-mentioned gum disease which added the matter more than a kind chosen from offering the prevention and the improvement agent of gum disease which make an active principle the compound which has a sphingosine frame and calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K. Moreover, this invention makes it a technical problem to offer the above-mentioned eating-and-drinking article or the feed which added the matter more than a kind chosen from offering the eating-and-drinking article or feed which blended the compound which has a sphingosine frame and granted prevention and the improvement effect of gum disease and calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K.

[0004]

[Means for Solving the Problem] In this invention, the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, is used as prevention of gum disease, and an active principle of an improvement agent. Moreover, in this invention, the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, is blended with an eating-and-drinking article or feed, and prevention and the improvement effect of gum disease are granted. Sphingosine is one sort of the long chain base which constitutes sphingolipid, and is widely distributed in a living body. Sphingosine is in the living body, it carried out acid-amide association with the fatty acid, constituted ceramide, and has accomplished the frame of sphingolipid.

[0005] Sphingolipid is a component which constitutes a cell membrane and the most exists as sphingoglycolipid or sphingophospholipid. Many sphingolipid to a brain, a nervous system, or an erythrocyte is contained. Moreover, although contained also in various food, it is contained mostly especially in cow's milk. Very many reports have been made about the physiological function of sphingolipid until now. For example, it is checking sphingosine protein-kinase C, having the operation which promotes differentiation of monocyte or a macrophage system cell, having the operation which adjusts the function of an epidermal growth factor (EGF) receptor, etc. Moreover, ganglioside is applied also to the therapy of a brain ischemia failure or the brain disorder by Parkinson's disease also in sphingolipid.

[0006] A coal chemical product and the thing of the animals-and-plants origin should just be used for compounds, such as ceramide of a compound which has a sphingosine frame, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside. And since these compounds are contained in cow's milk, a bovine brain, etc., they can use cow's milk and bovine brains, such as fresh milk, milk powder, a skimmilk, and recombined milk, as a raw material, and can obtain them by processing various chromatographies, such as heating, salting, a fortification of alcohol, ion exchange chromatography, and gel filtration chromatography, an ultrafiltration (UF), etc. In addition, since it has thermal stability, in case it blends with an eating-and-drinking article, feed, etc. especially, the compound which has a sphingosine frame is dealt with extremely, and it is easy to carry out it. Moreover, in this invention, in order to heighten prevention of the gum disease which makes an active principle the compound which has the above-mentioned sphingosine frame, and the

effectiveness of an improvement agent, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added. Moreover, in this invention, in order to heighten the effectiveness of the eating-and-drinking article which blended the compound which has the above-mentioned sphingosine frame, and granted prevention and the improvement effect of gum disease, or feed, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added. It is desirable to use the good calcium salt of absorptivity as calcium preparations used by this invention, for example, although calcium salts, such as a calcium chloride, a calcium carbonate, and a calcium lactate, an egg shell, or the calcium content constituent of the cow's milk origin can be mentioned. Moreover, it is desirable to blend a component effective in bones, such as vitamin D and a vitamin K. The compound and operation mechanism which have a sphingosine frame differ from each other, and such calcium preparations and vitamins take effect in multiplication to a bone.

[0007]

[Embodiment of the Invention] In this invention, prevention and the improvement agent of gum disease are prepared by making into an active principle compounds, such as a coal chemical product or ceramide which has cow's milk and the sphingosine frame of the bovine brain origin, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added further, and prevention and the improvement agent of gum disease are prepared. Moreover, in this invention, the eating-and-drinking article or feed which blended compounds, such as a coal chemical product or ceramide which has cow's milk and the sphingosine frame of the bovine brain origin, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, and granted prevention and the improvement effect of gum disease is prepared, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added further, and the eating-and-drinking article or feed which granted prevention and the improvement effect of gum disease is prepared.

[0008] In this invention, gum disease can be prevented and improved by taking in 1micro per one adult day g-10mg for the compound which has a sphingosine frame in several steps. Therefore, what is necessary is just to blend with an eating-and-drinking article or feed the compound which has a sphingosine frame so that those amounts can be taken in. furthermore, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K -- suitable ***** -- things can raise prevention and the improvement effect of gum disease. In addition, as an eating-and-drinking article, cow's milk, a milk beverage, juice, jelly, a biscuit, a pan, noodles, a sausage, etc. can be mentioned, for example. Next, an example and the example of a trial are shown and this invention is explained to a detail.

[0009]

[The example 1 of reference] Preparation of the ganglioside of the cow's milk origin; the well-known ganglioside method of preparation (Provisional-Publication-No. 63 No. - 369992 official report) It followed and the ganglioside of the cow's milk origin was prepared. That is, after making the trypsin of a proteolytic enzyme act on the milk quality matter containing ganglioside at 40 degrees C for 15 hours and disassembling protein, the obtained proteolysis object solution was dialyzed by the film of the molecular weight fractionation 10,000, and the ganglioside quantity content fraction was obtained. After freeze-drying this ganglioside quantity content fraction, it dissolved in the chloroform-

methanol (1:1) solution, this solution was dipped in anion exchange resin (a DEAE-Sephadex acetate mold, Pharmacia manufacture), and ganglioside was made to adsorb. Next, after the chloroform-methanol (1:1) solution washed anion exchange resin, ganglioside was eluted with the 0.1M sodium acetate water-solution-methanol solution. And it dialyzed, desalted and freeze-dried, after carrying out reduced pressure hardening by drying of the eluate. Thus, when thin-layer chromatography (the resorcinol method) detected the obtained ganglioside fraction (fraction A), it was the ganglioside GM3:ganglioside GD3:ganglioside GT 3= 10:90:1. Furthermore, fractionation of the fraction A was carried out. namely, chloroform-methanol (8:8 (v/v)) a solution -- Fraction A -- suspending -- a silica gel (Iatrobeads, product made from iatron laboratory) column - - adding -- 8:2 (v/v) from -- 2:8 (v/v) up to -- gradient elution was carried out with the chloroform-methanol solution, and fractionation was carried out to ganglioside GM3 fraction (fraction B), ganglioside GD3 fraction (fraction C), and ganglioside GT3 fraction (fraction D). Thus, when thin-layer chromatography (the resorcinol method) detected each obtained ganglioside fraction, purity was 95% or more.

[0010]

[The example 2 of reference] Preparation of the ganglioside of the bovine brain origin; the ganglioside of the bovine brain origin was prepared according to the ganglioside method of preparation currently generally performed widely. That is, it extracts immediately after slaughter, after freeze-drying 5kg of bovine brains saved at -20 degrees C, it considers as coarse powder by the mixer, and it is a methanol. 10 l In addition, it heated at 60 degrees C, and was left for 30 minutes, and the fraction containing ganglioside was extracted and the filtrate obtained by carrying out suction filtration immediately was left at -10 degrees C after the extract overnight. and suction filtration of the generated precipitation is carried out quickly, and it is collected -- after carrying out Folch distribution, vacuum concentration of the upper layer was carried out, and it freeze-dried. Thus, the obtained fraction is processed with a silica gel column chromatography, neutral lipid and sulfatide are separated, and it is 4.87g (fraction E) of ganglioside fractions. It obtained. Thus, ganglioside GD1a, ganglioside GM 1, ganglioside GD1b, ganglioside GT1b, etc. were contained in the obtained fraction E. Furthermore, fractionation of the fraction E was carried out. Namely, Q-Sepharose To a column, it is a chloroform-methanol-water (30:60:8) solution. The fraction E which dissolved in 500ml is added. Chloroform-methanol-water (30:60:8) solution From 3 l to a chloroform-methanol-4M sodium acetate water-solution (30:60:8) solution Gradient elution is carried out even by 3 l. One a(fraction F) 1,220mg of gangliosides GD, ganglioside GM1102(fraction G) mg, one b451 (fraction H)mg of gangliosides GD, and one b540 (fraction I)mg of gangliosides GT were obtained.

[0011]

[The example 3 of reference] Preparation of the sphingomyelin of the cow's milk origin; sphingomyelin was prepared from cow's milk. That is, it is methanol 90 l at 60 degrees C about this after freeze-drying butter SERAMU 10kg discharged in case butter oil is manufactured. It dissolved. After leaving it at a room temperature for 12 hours, vacuum concentration of the supernatant liquid was collected and carried out, and the methanol was removed so that the generated precipitation might not mix. It is deionized water about the obtained solid. 10 l After dissolving, the ultrafiltration was carried out, the low-molecular fraction was removed, it freeze-dried and the macromolecule fraction was

obtained. This macromolecule fraction was 600g and the sphingomyelin content contained in this macromolecule fraction was 15.2%. Furthermore, in order to refine sphingomyelin, the silica gel column chromatography refined. Namely, silica gel column 10 l Chloroform which dissolved 500g of macromolecule fractions containing sphingomyelin: The methanol (9:1) solution was added. And methanol concentration was raised, gradient elution was carried out, and 37.3g (fraction J) of sphingomyelin fractions was obtained. Thus, the obtained sphingomyelin fraction was 98% or more of purity.

[0012]

[The example 4 of reference] Preparation of the ceramide of the cow's milk origin; ceramide was prepared from the ganglioside fraction (fraction A) obtained in the example 1 of reference. That is, fraction A 20g is received in the acetic-acid buffer solution (pH 5.5). Endoglycoceramidase(TAKARA SHUZO CO., LTD. make)500U was added, and it was made to react for 12 hours. After the reaction, the Folch distribution of the reaction mixture were carried out, lipid fractions were collected, and the anion-exchange-resin column chromatography removed the glycolipid. And an octadecyl silyl column chromatography refines a ceramide part, and nitrogen was sprayed and it was made to harden by drying. Thus, 6g (fraction K) of ceramide fractions was obtained. This ceramide fraction was 98% or more of purity.

[0013]

[The example 1 of a trial] Osteoclastis depressor effect of the compound which has a sphingosine frame; after extracting the long long bone of the ICR system mouse of ten days after the birth - 20 age in day and removing tissue, the fragment of the bone was mechanically carried out in the alpha-MEN solution which contains fetal calf serum 5%, and all the bone marrow cells containing an osteoclast were obtained. On the piece of ivory, it is this cell About 2×10^6 The spot of the cell was carried out with the alpha-MEN solution which contains fetal calf serum 5%. It is 50 ng(s)/ml about the compound which has a sphingosine frame several hours after. The alpha-MEN solution containing added 5% fetal calf serum was added so that it might become concentration, and it cultivated for five days at 37 degrees C under 5% carbon-dioxide existence, and the osteoclastis activity of an osteoclast was investigated. The haematoxylin stain of ivory Kataue's cell was removed and carried out after culture, image analysis was carried out with image-analysis equipment (PIASLA-555, product made from PIAS), and the number of osteoclastis socket (pit) was measured. And the osteoclastis activity (%) defined by the degree type was searched for, and osteoclastis depressor effect was evaluated.

osteoclastis activity (%) = (number of osteoclastis socket of number of osteoclastis socket / additive-free group) x 100 -- in addition as a compound which has a sphingosine frame, fraction A-K obtained in the examples 1-4 of reference was used. The result is shown in Table 1.

[0014]

[Table 1]

----- Test sample Osteoclastis activity (% , **SD)

----- Fraction A 53.4**7.8 Fraction B 56.5**8.4 Fraction C 46.8**5.7
 Fraction D 67.6**4.5 Fraction E 54.3**7.5 Fraction F 51.5**6.4 Fraction G 57.3**5.1
 Fraction H 50.6**4.8 Fraction I 65.3**3.4 Fraction J 42.3**4.6 Fraction K 50.5**3.9-----

[0015] When cultivated by the culture medium which added the compound which has a sphingosine frame, compared with the time of cultivating by the

additive-free culture medium, osteoclasts is controlled and it has checked that the osteoclasts depressor effect excellent in the compound which has a sphingosine frame was shown.

[0016]

[The example 2 of a trial] After carrying out preliminary breeding of the golden hamster of 6 weeks old of evaluations of the amount of fasset osteopenia for one week, under anesthesia Suture silk thread for an operation which sterilized to the gingiva of M1 No4 is twisted around five-fold. Keyes ** -- feed (400 D#2000: Keyes, P.H. and Jordan, and Archs. Oral. Biol., vol. 9, pp.377- 1964) The symptoms of gum disease was made shown by breeding. Subsequently, these six golden hamsters are divided into each 4 of a control group, a fraction A group, a fraction E group, and a fraction J group groups, and a fraction A group, a fraction E group, and a fraction J group are [two days and] each fraction. 4microg Treatment which dips the inside of the oral cavity continuously for about 10 minutes with the test fluid diluted suitably was performed. After carrying out fixed inflow for about 20 minutes using the four-week back of treatment initiation, and a 2.5% glutaraldehyde solution (pH 7.4), mandible both sides were extracted. After fixing with evaluation of the amount of fasset osteopenia, and a 2.5% glutaraldehyde solution, soft-X-ray photography was carried out, using image-analysis equipment (PIASLA-555, product made from PIAS), the enamel cement boundary of the M1 neighborhood and the area between the fasset zeniths were measured, and the photograph was evaluated as an amount of fasset osteopenia. The result is shown in Table 2.

[0017]

[Table 2]

----- A fraction Contrast ----- A E J -----
 ----- reduction area (mm2) Four days 0.31 0.16 * 0.18 * 0.15 * Seven days 0.98
 0.53 * 0.58 * 0.47 * ----- * They are those with a significant
 difference to a control group. (P< 0.05) [0018] As shown in Table 2, the golden hamster
 of a fraction A group, a fraction E group, and a fraction J group was understood that the
 amount of fasset osteopenia is intentionally low clearly compared with the control group.
 The compound which has a sphingosine frame controlled fasset osteopenia, and this
 showed that effectiveness was in prevention of gum disease. in addition, this
 effectiveness -- concentration -- it also turned out that it is anaclitic.

[0019]

[Example 1] Manufacture of a drink; ganglioside 0.00005 of the cow's milk origin in the raw material of combination of Table 3 Weight % and vitamin D 200IU were added, it mixed, the container was filled up, it heat-sterilized, and the drink which granted prevention and the improvement effect of gum disease was manufactured.

[0020]

[Table 3]

----- mixed isomerism-ized sugar 15.0 (% of the weight)
 Fruit juice 10.0 citric acids 0.5 perfume 0.1 calcium 0.5 water 73.9-----
 [0021]

[Example 2] Manufacture of a tablet; 0.0001 % of the weight of gangliosides, vitamin D of the cow's milk origin in the raw material of combination of Table 4 200IU was added, it mixed, pressurization molding was carried out, and the tablet which granted prevention and the improvement effect of gum disease was manufactured.

[0022]

[Table 4]

----- Hydrated crystal grape sugar 93.5 (% of the weight)

Calcium 5.0 Sugar ester 1.0 Perfume 0.5----- [0023]

[Example 3] Manufacture of a biscuit; ganglioside 0.00001 of the bovine brain origin in the raw material of combination of Table 5 Weight % was added and it mixed, and after creating and casting dough, calcining was carried out and the biscuit which granted prevention and the improvement effect of gum disease was manufactured.

[0024]

[Table 5]

----- wheat flour 50.0 (% of the weight)

Sugar 20.0 salt 0.5 margarine 12.5 eggs 12.5 water 3.7 sodium hydrogencarbonates 0.1 ammonium bicarbonates 0.2 calcium carbonates 0.5----- [0025]

[Example 4] Manufacture of jelly; sphingomyelin 0.00001 of the cow's milk origin in the raw material of combination of Table 6 After having added weight %, mixing and filling up a container, it heat-sterilized and the jelly which granted prevention and the improvement effect of gum disease was manufactured.

[0026]

[Table 6]

----- Fruit sugar 20.0 (% of the weight)

Granulated sugar 15.0 Starch syrup 5.0 Agar 1.0 Perfume 0.1 Calcium 0.1 Water 58.8----- [0027]

[Example 5] Manufacture of process cheese; 0.0001 % of the weight of gangliosides of the cow's milk origin was added to the raw material of combination of Table 7, and it mixed, it emulsified at the emulsification temperature of 85 degrees C, and the process cheese which granted prevention and the improvement effect of gum disease was manufactured.

[0028]

[Table 7]

----- Gouda 43.0 (% of the weight)

Cheddar cheese 43.5 sodium citrates Calcium of the 2.0 cow's-milk origin 1.0 water 10.5----- [0029]

[Example 6] After heat-sterilizing for 20 minutes at 90 degrees C to a skimmilk 12%, the *Lactobacillus DERUBURUKKI* subspecies *bulgaricus* (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) and *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) were inoculated, respectively, and two kinds of starter cultures were acquired. And it is the ganglioside 0.00001 of the bovine brain origin in the raw material of combination of Table 8, using as a principal component the yogurt mix which makes cow's milk a subject. After adding weight % and mixing, fermentation cooling was performed according to the conventional method, and the yogurt which granted prevention and the improvement effect of gum disease was manufactured.

[0030]

[Table 8]

----- yogurt mix 97.0 (% of the weight)

Culture (*L. bulgaricus*) 1.5 cultures (*S. thermophilus*) 1.5----- [0031]

[Example 7] Manufacture of dog food; 0.0002 % of the weight of gangliosides of the

cow's milk origin was added to the raw material of combination of Table 9, it mixed, and the dog food (feed for dog breeding) which granted prevention and the improvement effect of gum disease was manufactured.

[0032]

[Table 9]

----- soybean cake 12.0 (% of the weight)

Skimmilk powder 14.0 soybean oil 4.0 corn oil 2.0 palm oil 28.0 amylum maydis 15.0

wheat flour 9.0 wheat bran 2.0 vitamin mixture 9.0 mineral mixture 2.0 celluloses 3.0-----

----- [0033]

[Example 8] Manufacture of a tooth paste; the container was filled up with the cream which added 0.0002 % of the weight of sphingomyelins of the cow's milk origin to the raw material of combination shown in Table 10, and was mixed, and prevention of gum disease and the tooth paste for an improvement were manufactured.

[0034]

[Table 10]

----- A glycerol 70.0 (% of the weight) Silicon dioxide 20.0 Xanthan gum 1.0 MINTOFUREBA 1.0 Titanium dioxide 0.7 Sodium fluoride 0.3 Distilled water 7.0----- [0035]

[Example 9] Manufacture of a collutory; 0.0001 % of the weight of sphingomyelins of the cow's milk origin was added to the raw material of combination shown in Table 11, and prevention of gum disease and the collutory for an improvement were manufactured.

[0036]

[Table 11]

----- Ethanol 8.0 (% of the weight) Perfume 1.0 Sorbitol 5.0 Propylene glycol 5.0 Distilled water 81.0----- [0037]

[Example 10] Manufacture of gum; the gum base was dissolved in water, 0.0002 % of the weight of gangliosides of the cow's milk origin was added to the raw material of combination shown in Table 12, after mixed churning, it fabricated and prevention of gum disease and the gum for an improvement were manufactured.

[0038]

[Table 12]

----- gum base 20.0 Corn syrup (% of the weight) 10.0 glucose and 1 hydrate 10.0 lactoses 5.0 glycerols 5.0 water 50.0----- [0039]

[Effect of the Invention] Prevention and the improvement agent of gum disease can be offered by making into an active principle the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside. Moreover, the eating-and-drinking article or feed which granted prevention and the improvement effect of gum disease can be offered by blending the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside. Furthermore, each effectiveness can be heightened adding calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K to the above-mentioned prevention and the above-mentioned improvement agent of gum disease, or by adding calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K to the eating-and-drinking article or feed which granted the above-mentioned prevention and the above-mentioned improvement effect of gum disease.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-158735

(P2001-158735A)

(43) 公開日 平成13年6月12日 (2001.6.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 6 1 K	31/164	A 6 1 K 31/164	4 B 0 1 8
A 2 3 L	1/30	A 2 3 L 1/30	Z 4 C 0 8 3
A 6 1 K	7/16	A 6 1 K 7/16	4 C 0 8 6
	31/688	31/688	4 C 2 0 6
	31/7032	31/7032	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-340174	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号
(22) 出願日	平成11年11月30日 (1999. 11. 30)	(72) 発明者	高田 幸宏 埼玉県川越市小堤62-22
		(72) 発明者	松原 範宜 北海道札幌市白石区中央2条7-5-6 光 シティー I I B-8
		(72) 発明者	柳平 修一 埼玉県鶴ヶ島市富士見5-2-4
		(74) 代理人	100105061 弁理士 児玉 喜博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯周病の予防及び改善剤

(57) 【要約】

【課題】 歯周病の予防及び改善剤、あるいは歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料の提供。

【解決手段】 セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とし、あるいはスフィンゴシン骨格を有する化合物を配合し、さらに、適宜、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えることによって、歯周病の予防及び改善効果を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする歯周病の予防及び改善剤。

【請求項2】 スフィンゴシン骨格を有する化合物が、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質又はガングリオシドである請求項1記載の歯周病の予防及び改善剤。

【請求項3】 スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする歯周病の予防及び改善剤に関する。また、本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、歯周病が大きな社会問題となっている。歯周病は、虫歯と異なり、歯の根元を弱らせて虫歯のない歯をも使えなくする病気である。多くの人は、歯周病の兆候を示しており、むしろ虫歯よりも怖い病気であるといえる。現在、歯周病の予防法としては、歯垢を除去することや抗菌剤含有のうがい剤（マウスウォッシュ）などを使用したが、原因菌となる微生物の繁殖を防止するという観点からの予防が行われているが、これらの方法は過度に進行した症状に対しては効果が小さいと考えられている。すなわち、歯周病の末期には、歯槽骨の減少が見られ、一度歯槽骨が失われると再生され難くなる。そして、歯周病により歯を失うと、食物が食べ難くなる外に、痛みを伴うことなどから生活に支障をきたすので、有効な歯周病の予防及び治療手段が求められている。このように、現状では、歯槽骨の減少を抑制する効果を有する歯周病の予防及び改善剤は知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記するように、歯周病は、大きな社会問題になっており、これらの症状を予防及び改善する方法が求められている。本発明者らは、歯周病の予防及び改善効果を有する物質を得るべく鋭意研究を進めてきたところ、牛乳や牛乳中に含まれるセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物に歯周病を予防及び改善する効果があることを見出した。そして、カルシウム剤、ビタミンD、ビタミンKを加えることによりその効果が高まることを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする歯周病の予防及び改善剤を提供すること、及びカルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えた

上記の歯周病の予防及び改善剤を提供することを課題とする。また、本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料を提供すること、及びカルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えた上記の飲食品又は飼料を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明では、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を歯周病の予防及び改善剤の有効成分として使用する。また、本発明では、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を飲食品や飼料に配合して歯周病の予防及び改善効果を賦与する。スフィンゴシンは、スフィンゴ脂質を構成する長鎖塩基の1種であり、生体中に広く分布している。スフィンゴシンは、生体内で、脂肪酸と酸アミド結合してセラミドを構成し、スフィンゴ脂質の骨格を成している。

【0005】スフィンゴ脂質は、細胞膜を構成する成分であり、その大部分がスフィンゴ糖脂質やスフィンゴリン脂質として存在している。スフィンゴ脂質は、脳や神経系又は赤血球に多く含まれている。また、種々の食品中にも含まれているが、特に牛乳中に多く含まれている。スフィンゴ脂質の生理作用に関しては、非常に多くの報告がこれまでになされてきている。例えば、スフィンゴシン蛋白質リン酸化酵素Cを阻害すること、単球やマクロファージ系細胞の分化を促進する作用を有すること、上皮細胞成長因子（EGF）レセプターの機能を調節する作用を有することなどである。また、スフィンゴ脂質の中でも、ガングリオシドは、脳虚血障害やパーキンソン病による脳障害の治療にも応用されている。

【0006】スフィンゴシン骨格を有する化合物のセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどの化合物は、化成品や動植物由来のものを使用すれば良い。そして、これらの化合物は、牛乳や牛乳などに含まれているので、生乳、粉乳、脱脂乳、還元乳などの牛乳や牛乳を原料とし、加熱、加塩、アルコール添加、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィー、限外濾過（UF）などの処理を行うことにより得ることができる。なお、スフィンゴシン骨格を有する化合物は熱安定性を有するので、特に飲食品や飼料などに配合する際に極めて取り扱い易い。また、本発明では、上記したスフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする歯周病の予防及び改善剤の効果を高めるために、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加える。また、本発明では、上記したスフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して歯周病の予防及び改

善効果を賦与した飲食品や飼料の効果を高めるために、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加える。本発明で使用するカルシウム剤としては、例えば、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウムなどのカルシウム塩、卵殻、あるいは牛乳由来のカルシウム含有組成物などを挙げることができるが、吸収性の良いカルシウム塩を使用することが望ましい。また、ビタミンDやビタミンKなどの骨に有効な成分を配合することが望ましい。このようなカルシウム剤やビタミン類は、スフィンゴシン骨格を有する化合物と作用機作が異なり、骨に対して相乗的に効果を示す。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明においては、化成品、あるいは牛乳や牛脳由来のスフィンゴシン骨格を有するセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどの化合物を有効成分として、歯周病の予防及び改善剤を調製し、さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えて、歯周病の予防及び改善剤を調製する。また、本発明においては、化成品、あるいは牛乳や牛脳由来のスフィンゴシン骨格を有するセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどの化合物を配合して歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料を調製し、さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えて、歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料を調製する。

【0008】本発明においては、スフィンゴシン骨格を有する化合物を成人一人一日当たり $1\mu\text{g}$ ～10mgを数回に分けて摂取することにより、歯周病を予防及び改善することができる。したがって、それらの量を摂取することができるように、スフィンゴシン骨格を有する化合物を飲食品や飼料に配合すれば良い。さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を適量加えることにより、歯周病の予防及び改善効果を高めることができる。なお、飲食品としては、例えば、牛乳、乳飲料、ジュース、ゼリー、ビスケット、パン、麺、ソーセージなどを挙げることができる。次に、実施例及び試験例を示し、本発明を詳細に説明する。

【0009】

【参考例1】牛乳由来のガングリオシドの調製；公知のガングリオシド調製法（特開昭 63-369992号公報）に従い、牛乳由来のガングリオシドを調製した。すなわち、ガングリオシドを含む乳質物質に蛋白質分解酵素のトリプシンを40℃で15時間作用させて蛋白質を分解した後、得られた蛋白質分解物溶液を分子量分画10,000の膜で透析して、ガングリオシド高含有画分を得た。このガングリオシド高含有画分を凍結乾燥した後、クロロホルム-

メタノール（1：1）溶液に溶解し、この溶液を陰イオン交換樹脂（DEAE-Sephadexアセテート型、ファルマシア社製）に通液して、ガングリオシドを吸着させた。次に、陰イオン交換樹脂をクロロホルム-メタノール

（1：1）溶液で洗浄した後、0.1M酢酸ナトリウム水溶液-メタノール溶液でガングリオシドを溶出した。そして、溶出液を減圧乾固した後、透析して脱塩し、凍結乾燥した。このようにして得られたガングリオシド画分

（画分A）を薄層クロマトグラフィー（レゾルシノール法）で検出したところ、ガングリオシドGM3：ガングリオシドGD3：ガングリオシドGT3=10：90：1であった。さらに、画分Aを分画した。すなわち、クロロホルム-メタノール（8：8（v/v））溶液に画分Aを懸濁し、シリカゲル（イアトロビーズ、iatron laboratory社製）カラムに添加して、8：2（v/v）から2：8（v/v）までのクロロホルム-メタノール溶液でグラジエント溶出し、ガングリオシドGM3画分（画分B）、ガングリオシドGD3画分（画分C）及びガングリオシドGT3画分（画分D）に分画した。このようにして得られた各ガングリオシド画分を薄層クロマトグラフィー（レゾルシノール法）で検出したところ、純度は95%以上であった。

【0010】

【参考例2】牛脳由来のガングリオシドの調製；一般に広く行われているガングリオシド調製法に従い、牛脳由来のガングリオシドを調製した。すなわち、屠殺直後に摘出し、-20℃で保存しておいた牛脳5kgを凍結乾燥した後、ミキサーで粗い粉末とし、メタノール 10 l を加えて60℃に加熱して30分放置し、ガングリオシドを含む画分を抽出し、抽出後、直ぐに吸引濾過して得られた濾液を-10℃で一晩放置した。そして、生成した沈澱を手早く吸引濾過して回収し、Folch分配した後、その上層を減圧濃縮し、凍結乾燥した。このようにして得られた画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで処理して、中性脂質及びスルファチドを分離し、ガングリオシド画分（画分E）4.87gを得た。このようにして得られた画分Eには、ガングリオシドGD1a、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGD1b、ガングリオシドGT1bなどが含まれていた。さらに、画分Eを分画した。すなわち、Q-Sepharose カラムに、クロロホルム-メタノール-水（30：60：8）溶液 500mlに溶解した画分Eを添加して、クロロホルム-メタノール-水（30：60：8）溶液 3 l からクロロホルム-メタノール-4M酢酸ナトリウム水溶液（30：60：8）溶液 3 l まででグラジエント溶出し、ガングリオシドGD1a（画分F）1,220mg、ガングリオシドGM1（画分G）102mg、ガングリオシドGD1b（画分H）451mg、ガングリオシドGT1b（画分I）540mgを得た。

【0011】

【参考例3】牛乳由来のスフィンゴミエリンの調製；牛

乳からスフィンゴミエリンを調製した。すなわち、バターオイルを製造する際に排出されるバターセラム10kgを凍結乾燥した後、これを60℃でメタノール90:1に溶解した。室温で12時間放置した後、生成した沈澱が混入しないように上清を回収し、減圧濃縮してメタノールを除去した。得られた固形物を脱イオン水 10:1 に溶解した後、限外濾過して低分子画分を除去し、凍結乾燥して高分子画分を得た。この高分子画分は600gであり、この高分子画分に含まれるスフィンゴミエリン含量は15.2%であった。さらに、スフィンゴミエリンを精製するために、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。すなわち、シリカゲルカラム 10:1 に、スフィンゴミエリンを含む高分子画分500gを溶解したクロロホルム:メタノール (9:1) 溶液を添加した。そして、メタノール濃度を高めてグラジエント溶出し、スフィンゴミエリン画分 (画分J) 37.3gを得た。このようにして得られたスフィンゴミエリン画分は純度98%以上であった。

【0012】

【参考例4】牛乳由来のセラミドの調製；参考例1で得られたガングリオシド画分 (画分A) からセラミドを調製した。すなわち、酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中で、画分A 20gに対して Endoglycoceramidase (宝酒造社製) 500Uを添加し、12時間反応させた。反応後、反応液をFolch分配して脂質画分を回収し、陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーで糖脂質を除去した。そして、オクタデシルシリルカラムクロマトグラフィーでセラミド部分を

精製し、窒素を吹き付け乾固させた。このようにして、セラミド画分 (画分K) 6gを得た。このセラミド画分は純度98%以上であった。

【0013】

【試験例1】スフィンゴシン骨格を有する化合物の骨吸収抑制効果；生後10日～20日齢のICR系マウスの長管骨を摘出し、軟組織を除去した後、5%牛胎児血清を含む α -MEN溶液中で骨を機械的に細切し、破骨細胞を含む全骨髄細胞を得た。この細胞を象牙片の上に、約 2×10^6 の細胞を5%牛胎児血清を含む α -MEN溶液でスポットした。数時間後、スフィンゴシン骨格を有する化合物を50ng/mlの濃度となるように添加した5%牛胎児血清を含む α -MEN溶液を加え、5%二酸化炭素存在下、37℃で5日間培養し、破骨細胞の骨吸収活性を調べた。培養後、象牙片上の細胞を剥がしてヘマトキシリン染色し、画像解析装置 (PIASLA-555、PIAS社製) により画像解析して、骨吸収窩 (pit) 数を測定した。そして、次式で定義される骨吸収活性 (%) を求め、骨吸収抑制効果を評価した。

骨吸収活性 (%) = (骨吸収窩数 / 無添加群の骨吸収窩数) \times 100

なお、スフィンゴシン骨格を有する化合物としては、参考例1～4で得られた画分A～Kを使用した。その結果を表1に示す。

【0014】

【表1】

試験試料	骨吸収活性 (% , \pm SD)
画分A	53.4 \pm 7.8
画分B	56.5 \pm 8.4
画分C	46.8 \pm 5.7
画分D	67.6 \pm 4.5
画分E	54.3 \pm 7.5
画分F	51.5 \pm 6.4
画分G	57.3 \pm 5.1
画分H	50.6 \pm 4.8
画分I	65.3 \pm 3.4
画分J	42.3 \pm 4.6
画分K	50.5 \pm 3.9

【0015】スフィンゴシン骨格を有する化合物を添加した培地で培養すると、無添加の培地で培養した時に比べて、骨吸収が抑制されており、スフィンゴシン骨格を有する化合物が優れた骨吸収抑制効果を示すことが確認できた。

【0016】

【試験例2】歯槽骨減少量の評価

6週齢のゴールデンハムスターを1週間予備飼育した後、エーテル麻酔下で、M1の歯頸部に滅菌した手術用縫

合絹糸 No4を5重に巻き付けて、Keyes らの飼料 (D#2000: Keyes, P.H. and Jordan, Archs. Oral. Biol., vol. 9, pp. 377-400, 1964) で飼育することにより歯周病を発病させた。次いで、このゴールデンハムスター6匹ずつを、対照群、画分A群、画分E群及び画分J群の4群に分け、画分A群、画分E群及び画分J群は、一日2回、各画分 4 μ g を適当に希釈した試験液で口腔内を約10分間絶えず浸す処置を行った。処置開始から4週間後、2.5%グルタルアルデヒド溶液 (pH 7.4) を用いて約20分

間固定灌流した後、下顎骨両側を摘出した。歯槽骨減少量の評価は、2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定した後、軟X線撮影して、写真を画像解析装置（PIASLA-555、PIAS社製）を用い、M1付近のエナメル

セメント境と歯槽骨頂間の面積を計測し、歯槽骨減少量として評価した。その結果を表2に示す。

【0017】

【表2】

		対照	画分		
			A	E	J
減少面積 (mm ²)	4日	0.31	0.16 *	0.18 *	0.15 *
	7日	0.98	0.53 *	0.58 *	0.47 *

* 対照群に対して有意差あり (P<0.05)

【0018】表2に示すように、画分A群、画分E群及び画分J群のゴールドデンハムスターは、対照群に比べて、明らかに歯槽骨減少量が有意に低いことが判った。このことから、スフィンゴシン骨格を有する化合物は、歯槽骨減少を抑制し、歯周病の予防に効果があることが判った。なお、この効果は濃度依存的であることも判った。

【0019】

【実施例1】飲料の製造；表3の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.00005重量%及びビタミンD200IUを加えて混合して容器に充填し、加熱滅菌して、歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲料を製造した。

【0020】

【表3】

含水結晶ブドウ糖	93.5 (重量%)
カルシウム	5.0
シュガーエステル	1.0
香料	0.5

【0023】

【実施例3】ビスケットの製造；表5の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.00001重量%を加えて混合してドウを作成し、成型した後、ばい焼して、歯周病の予防及び改善効果を賦与したビスケットを製造した。

【0024】

【表5】

小麦粉	50.0 (重量%)
砂糖	20.0
食塩	0.5
マーガリン	12.5
卵	12.5

果糖	20.0 (重量%)
グラニュー糖	15.0

混合異性化糖	15.0 (重量%)
果汁	10.0
クエン酸	0.5
香料	0.1
カルシウム	0.5
水	73.9

【0021】

【実施例2】錠剤の製造；表4の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.0001重量%及びビタミンD200IUを加えて混合し、加圧成型して、歯周病の予防及び改善効果を賦与した錠剤を製造した。

【0022】

【表4】

水	3.7
炭酸水素ナトリウム	0.1
重炭酸アンモニウム	0.2
炭酸カルシウム	0.5

【0025】

【実施例4】ゼリーの製造；表6の配合の原料に牛乳由来のスフィンゴミエリン0.00001重量%を加えて混合し、容器に充填した後、加熱滅菌して、歯周病の予防及び改善効果を賦与したゼリーを製造した。

【0026】

【表6】

水飴	5.0
寒天	1.0
香料	0.1
カルシウム	0.1
水	58.8

【0027】

【実施例5】プロセスチーズの製造；表7の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.0001重量%を加えて混合し、乳化温度85℃で乳化して、歯周病の予防及び改善効果を賦与したプロセスチーズを製造した。

【0028】

【表7】

ゴーダチーズ	43.0 (重量%)
チェダーチーズ	43.5
クエン酸ナトリウム	2.0
牛乳由来のカルシウム	1.0
水	10.5

【0029】

【実施例6】12%脱脂乳に90℃で20分間加熱殺菌した後、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシーズ・ブルガリクス (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 及びストレプトコッカス・サーモフィルス (*S. thermophilus*) をそれぞれ接種し、二種類のスターターカルチャーを得た。そして、牛乳を主体とするヨーグルトミックスを主成分として、表8の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.00001重量%を加えて混合した後、常法に従って発酵冷却を行い、歯周病の予防及び改善効果を賦与したヨーグルトを製造した。

【0030】

【表8】

ヨーグルトミックス	97.0 (重量%)
培養物 (<i>L. bulgaricus</i>)	1.5

グリセリン	70.0 (重量%)
二酸化ケイ素	20.0
キサンタンガム	1.0
ミントフレーバー	1.0
二酸化チタン	0.7
フッ化ナトリウム	0.3
蒸留水	7.0

【0035】

【実施例9】うがい剤の製造；表11に示す配合の原料に牛乳由来のスフィンゴミエリン0.0001重量%を加えて

エタノール	8.0 (重量%)
-------	-----------

培養物 (<i>S. thermophilus</i>)	1.5
--------------------------------	-----

【0031】

【実施例7】ドッグフードの製造；表9の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.0002重量%を加えて混合し、歯周病の予防及び改善効果を賦与したドッグフード（イヌ飼育用飼料）を製造した。

【0032】

【表9】

大豆粕	12.0 (重量%)
脱脂粉乳	14.0
大豆油	4.0
コーン油	2.0
パーム油	28.0
トウモロコシ澱粉	15.0
小麦粉	9.0
ふすま	2.0
ビタミン混合物	9.0
ミネラル混合物	2.0
セルロース	3.0

【0033】

【実施例8】歯磨き剤の製造；表10に示す配合の原料に牛乳由来のスフィンゴミエリン0.0002重量%を加えて混合したクリームを容器に充填し、歯周病の予防及び改善用歯磨き剤を製造した。

【0034】

【表10】

歯周病の予防及び改善用うがい剤を製造した。

【0036】

【表11】

香料	1.0
ソルビトール	5.0
プロピレングリコール	5.0
蒸留水	81.0

【0037】

【実施例10】ガムの製造；ガムベースを水に溶解し、表12に示す配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.0002重量%を加えて混合攪拌後、成形して、歯周病の予防及び改善用ガムを製造した。

【0038】

【表12】

ガムベース	20.0 (重量%)
コーンシロップ	10.0
デキストロース・1水和物	10.0
ラクトース	5.0
グリセリン	5.0
水	50.0

【0039】

【発明の効果】セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とすることにより、歯周病の予防及び改善剤を提供することができる。また、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を配合することにより、歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料を提供することができる。さらに、上記した歯周病の予防及び改善剤に、カルシウム剤、ビタミンD、ビタミンKを加えることにより、あるいは上記した歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料に、カルシウム剤、ビタミンD、ビタミンKを加えることにより、それぞれの効果を高めることができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. 7

識別記号

F 1

テーマコード (参考)

A 6 1 P 1/02
19/00

A 6 1 P 1/02
19/00

(72)発明者 川上 浩

埼玉県川越市藤間204-5

(72)発明者 青江 誠一郎

埼玉県狭山市新狭山2-8-9 ワコー第二
新狭山マンション406

Fターム(参考) 4B018 LB08 MD04 MD09 MD23 MD52
ME09 MF02
4C083 AA112 AB172 AB242 AB312
AB322 AB472 AC102 AC122
AC132 AC302 AC641 AD192
AD212 AD222 AD352 AD391
AD571 AD572 CC41 DD15
DD21 DD22 DD23 DD27 DD41
EE33
4C086 AA01 AA02 DA42 EA05 EA06
MA01 MA04 MA52 NA14 ZA67
ZC71
4C206 AA01 AA02 FA03 GA23 GA25
MA01 MA04 MA72 NA14 ZA67
ZC61